

(19)日本国特許庁(J P)

(12)特 許 公 報(B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-44860

(24)(44)公告日 平成6年(1994)6月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/00	Z			
1/02	A			

発明の数1(全 8 頁)

(21)出願番号	特願昭60-144810	(71)出願人	999999999 日本合成ゴム株式会社 東京都中央区築地2丁目11番24号
(22)出願日	昭和60年(1985)7月3日	(72)発明者	山田 敬一 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合 成ゴム株式会社内
(65)公開番号	特開昭62-6670	(72)発明者	刈屋 雅雄 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合 成ゴム株式会社内
(43)公開日	昭和62年(1987)1月13日	(72)発明者	戸崎 近雄 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本合 成ゴム株式会社内
		(74)代理人	弁理士 大井 正彦
		審査官	佐藤 雪枝
		(56)参考文献	特開 昭58-134989(J P, A) 実開 昭60-27699(J P, U)

(54)【発明の名称】 培養装置

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】液体培地を入れる容器と、この容器内に設けた、その容器壁の少なくとも一部が、培養される細胞もしくは植物組織に対し不透過性で液体培地透過性の網または膜により構成され、その全体が前記液体培地内に完全に浸漬された状態とされる内容器と、この内容器を実質上水平な軸の周りに自転するよう回転させる回転駆動部とを備えてなり、前記内容器が回転されることにより、当該内容器内の液体培地と、担体粒子に接着した接着依存性細胞、浮遊増殖性細胞もしくは植物組織との混合系が当該内容器と共に回転されることにより、前記内容器内において担体粒子に接着した接着依存性細胞、浮遊増殖性細胞もしくは植物組織が培養されることを特徴とする培養装置。

【発明の詳細な説明】

2

【産業上の利用分野】

本発明は細胞もしくは植物組織の培養装置に関するものである。

【従来の技術】

一般に細胞もしくは植物組織の培養においては、培養対象が浮遊増殖性細胞もしくは植物組織、すなわち液体培地中に細胞もしくは植物組織自体が浮遊した状態で増殖することが可能である場合には、その栄養源である液体培地中に浮遊させることにより培地と接触させることが必要であり、また培養対象が接着依存性細胞、すなわち液体培地中において生育および増殖するために基体に対する接着が必須の細胞である場合には、適当な基体の表面に当該細胞を接着させたくえて液体培地と接触させることが必要である。そして接着依存性細胞を接着させる基体としては、大きな接着面積を容易に得ることができ

ることから、最近においては小径の担体粒子が用いられるようになってきている。

このような接着依存性細胞、浮遊増殖性細胞もしくは植物組織の培養を行うための方法としては、従来、回転翼などの機械的攪拌機構により液体培地を攪拌しながらその中で細胞の培養を行う方法（特開昭50-100223合公報および特開昭59-146598合公報参照）、その他の方法が知られている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかして目的とする細胞の培養を高い効率で行うためには、培養対象細胞を常に新しい培地と接触させることが肝要であり、そのためには浮遊増殖性細胞、または接着依存性細胞が接着した担体粒子（以下これらを合わせて単に「細胞」ともいう。）を液体培地中に均一に分散せしめることが必要である。

また接着依存性細胞を基体である担体粒子に接着させる際にも、当該細胞が混合された液体培地中において担体粒子を均一に分散せしめることができれば、当該細胞の接着に利用することができる担体粒子の表面の有効利用面積が大きくなり、したがって高い接着率で細胞を担体粒子に接着することが可能となり、培養効率を高めるうえで極めて有利である。

従来において、培養対象細胞を常に新しい液体培地に接触させるための方法としては、液体培地中に培養対象細胞を混合した系を回転翼によって攪拌する方法が一般的であるが、しかしながらこの方法は液体培地と細胞との混合系に剪断力を加えて当該細胞を分散する方法であるため、回転翼との衝突によりあるいは大きな剪断力の作用により培養中の細胞が損傷されることを回避することができず、結局培養効率が低く、また細胞の種類によってはこの方法を用いることができない場合もあるという問題点を有する。

また上記の如き方法を実施するために、大量培養を目的として大容量の細胞培養装置を構成する場合には、攪拌のために大型の攪拌機が必要となり、したがって必然的に剪断力も大きくなり、そのため培養効率がさらに低下するようになるという問題点をも有する。このような問題点を解消するために種々の方策が研究されてはいるが、かかる問題点を本質的に解決する細胞培養装置は未だ開発されていないのが現状である。

上記状況は植物組織の培養においても同様である。

〔発明の目的〕

本発明は、以上の如き事情に基づき鋭意研究を重ねた結果完成されたものであって、その目的とするところは、液体培地と培養対象細胞もしくは植物組織との混合系に本質的に剪断力を与えることなく、液体培地中に細胞もしくは植物組織を均一に分散させることができ、高い効率で細胞もしくは植物組織の培養を行うことのできる装置を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明の培養装置は、液体培地を入れる容器と、この容器内に設けた、その容器壁の少なくとも一部が、培養される細胞もしくは植物組織に対し不透過性で液体培地透過性の網または膜により構成され、その全体が前記液体培地内に完全に浸漬された状態とされる内容容器と、この内容容器を実質上水平な軸の周りに自転するよう回転させる回転駆動部とを備えてなり、前記内容容器が回転されることにより、当該内容容器内の液体培地と、細胞もしくは植物組織との混合系が当該内容容器と共に回転されることにより、前記内容容器内において細胞もしくは植物組織が培養されることを特徴とするものであり、かかる構成により、内容容器内において、細胞もしくは植物組織を実質上剪断力を与えずに均一に分散せしめることができ、しかも網または膜を介して内容容器内外の液体培地の交換が可能であり、したがって高い高率で細胞もしくは植物組織の培養を行うことができる。

以下図面によって本発明を具体的に説明する。

第1図は本発明培養装置の一例を示す概略図であり、この第1図の例においては、容器部1と、回転駆動部2とにより装置が構成されている。

容器部1は、容器3と、筒状の内容容器4とにより構成され、容器3においては、実質的に水平な方向に伸び、内容容器4を容器3の側壁に回転可能に軸支するため一方の回転軸31および他方の回転軸32とが設けられている。この例においては、他方の回転軸32はその軸内部が中空であって、液体培地を内容容器4内に循環（矢印で示す方向）させるための通路を形成しており、この他方の回転軸32は容器3の外部から内容容器4内に挿通された状態で配設され、その端部開口33は内容容器4内に連通している。容器3の外部においては他方の回転軸32に接続された管が屈曲して上方に伸び、その端部開口34が容器3の上部から当該容器3の内部に充填された液体培地5内に埋没された状態に配置され、これにより液体培地5を循環するための培地循環管35が構成されている。36はポンプであり、このポンプ36により必要に応じて容器3の上部の液体培地が培地循環管35を通して内容容器4内に循環される。

内容容器4は、細胞もしくは植物組織に対し不透過性で液体培地透過性の網または膜41により構成された筒壁42と、この筒壁42の両端部を塞ぐよう設けた側板43および44と、これら側板43および44を連結して前記筒壁42を保持する連結板（図示せず）により構成されている。前記網または膜41は上述したように細胞もしくは植物組織に対し不透過性で液体培地透過性のものであり、これよりなる筒壁42を介して液体培地のみが内容容器4の内部から外部へあるいは外部から内部へと移動することができ、しかも内容容器4内の担体粒子に接着した接着依存性細胞、浮遊増殖性細胞もしくは植物組織は当該筒壁42を通過することができないので、培養対象である細胞もしくは植物組織は確実に内容容器4内に存在する状態となる。

したがって内容器4を回転させることにより培養対象細胞もしくは植物組織を均一に分散させながら当該培養対象細胞もしくは植物組織を常時新しい液体培地と接触させた状態で培養を行うことができる。また必要に応じて前記ポンプ36により容器3の上部の液体培地を培地循環管35を通して内容器4内に循環させるようにしてもよく、この場合には内容器4内の液体培地の交換を迅速に行うことができる。

前記網または膜41の孔のサイズは培養対象細胞もしくは植物組織の大きさなどを勘案して選定され、一概に規定することはできないが、例えば接着依存性細胞が接着した担体粒子を内容器4内に存在させて培養を行う場合には孔のサイズは、通常、5~200 $\mu$ m、好ましくは10~50 $\mu$ mであり、浮遊増殖性細胞を内容器4内に存在させて培養を行う場合には孔のサイズは、通常0.1~10 $\mu$ m、好ましくは3~5 $\mu$ mである、また植物組織を内容器4内に存在させて培養を行う場合には孔のサイズは、通常0.5~200 $\mu$ m、好ましくは3~10 $\mu$ mである。前記網または膜41を構成する材質は、細胞もしくは植物組織の培養に支障をきたさないものであれば、特に限定

されるものではないが、例えばナイロンおよびテフロン（商品名）などを用いることができる。回転駆動部2は、この例においては、モーター21と、このモーター21により回転される回転磁石体22とにより構成され、回転磁石体22は、モーター21に軸支されその回転軸が水平となるよう位置された保持板23と、この保持板23に固定された磁石24とにより構成されている。内容器4の一方の側板43には磁石45が固定して設けられ、この磁石45に対向するよう回転磁石体22が配置され、モーター21により回転磁石体22を回転させることにより、磁石24と磁石45との間の磁力により内容器4を回転軸31および32の周りに自転するよう回転させることができる。この回転駆動部2においては、その構成は特に限定されず、内容器4を回転させる方法は自由に選択することができる。

内容器4の回転軸31および32は実質上水平に配置されていることが好ましく、そのようにすることにより内容器4内において液体培地中の細胞もしくは植物組織を一層均一に分散させることができる。すなわち、内容器4が自転されている状態においては、内容器4内の液体培地と細胞もしくは植物組織との混合系が液体培地の粘性により内容器4といわば一体的に機械的な流れのない状態に回転軸の周りに定常的に回転するようになり、したがって細胞もしくは細胞組織は内容器4内の液体培地に対する相対的位置をほとんど変えることなく内容器4外に対する存在位置を変えることとなり、このため内容器4内の細胞もしくは植物組織には順次異なる方向から重力が作用する状態となってこれにより細胞もしくは植物組織が液体培地内に均一に分散するようになる。これは、1個の細胞もしくは植物組織について見ると、第5図に

模式的に示すように、液体培地5内において、当該細胞もしくは植物組織Pが、相対的に矢印Aで示すような円運動をすることとなり、この運動力により、細胞もしくは植物組織Pが液体培地5内において均一に分散するものと考えられる。ここにおいて回転軸31および32が実質上水平であるとは、回転軸31および32の傾きが例えば水平に対して最大約15度程度までの範囲内である場合をいい、好ましくは水平に対して5度以内、より好ましくは3度以内の傾きであるが、いずれの場合においても内容器4は完全に液体培地内に浸漬されるものとする。

内容器4の回転速度は、培養対象細胞もしくは植物組織の大きさおよび比重、液体培地の粘度、内容器4の形状および大きさなどを勘案して選定され、一概に規定することはできないが、通常は3~60 r.p.m.、好ましくは10~30 r.p.m.程度の回転速度となるように内容器4を回転させる。

61は容器3の上部に設けた送気管であり、この送気管61により容器3の上部空間には細胞の場合例えば濃度が5%の炭酸ガスを含む空気を、植物組織の場合は空気を供給し、これにより液体培地5の溶存酸素量を細胞および植物組織のそれぞれに適した一定の状態に保つことができる。また必要に応じて液体培地5内に直接上記空気をバブリングさせながら供給してもよく、この場合においては内容器4の内部には気泡は入らないので気泡により細胞もしくは植物組織に損傷を与えることなく液体培地の溶存酸素量を調節することができる。さらに、液体培地供給管63より一定の割合で液体培地を供給すると同時に、液体培地排出管64より同一割合で液体培地を排することもできる。62は排気管、65はpHセンサー、66はDOセンサーである。

第2図は、本発明培養装置を用いて細胞もしくは植物組織の培養を行う場合のシステムチャートの一例であって、70は液体培地タンク、71は培養容器、72は液体培地排出タンクを示し、モニター機構73によって培養容器71の液体培地について例えばpHセンサー74によりpHを、ならびにDOセンサー75により溶存酸素量を検出し、その結果にしたがって培養容器71に供給される炭酸ガスおよび酸素、空気の供給量を制御する。

第1図に示した構成の培養装置によれば、内容器4の筒壁42が細胞もしくは植物組織に対し不透過性で液体培地透過性の網または膜41により構成されているので、当該筒壁42を介して液体培地のみが内容器4の内部から外部へあるいは外部から内部へと移動することができ、したがって培養対象細胞もしくは植物組織を常時新しい液体培地と接触させることができ、しかも内容器4内の培養対象細胞もしくは植物組織は当該筒壁42を通過することができないので、培養対象細胞もしくは植物組織は確実に内容器4内に存在する状態となり、そしてこのように内容器4内に培養対象細胞もしくは植物組織を存在させた状態で当該内容器4を回転させながら培養

を行うので培養対象である細胞もしくは植物組織を内容  
器4内の液体培地中に均一に分散させた状態で培養を行  
うことができ、この結果後述する培養実施例の説明から  
も理解されるように高い効率で培養対象細胞もしくは植  
物組織の培養を達成することができる。

そしてこの例においては、内容器4の他方の回転軸32は  
その内部が中空であって液体培地を循環するための通路  
すなわち培地循環管35を形成しているため、必要に応じ  
てこの培地循環管35により内容器3の上部の新しい液体培  
地を内容器4内に循環させることができ、したがって簡  
単な構成で内容器4内の液体培地の交換を迅速に行うこ  
とができる。そして培地循環管35の培地出口である他方  
の回転軸32の端部開口33は内容器4内の中央すなわち内  
容器4の回転の中心軸上に位置されることとなるため、  
内容器4を回転させた状態においては新しい液体培地を  
偏ることなく内容器4内の全体に循環させることができ  
る。

第3図および第4図は、それぞれ本発明培養装置の他の  
例を示す説明用正面図および説明用側面図である。この  
例においては、内容器81が実質上水平に伸びる一対の回  
転軸82および83により内容器84内に回転可能に軸支され、  
内容器81の側壁部85には、内容器81外の液体培地を内容  
器81内に供給するための開閉弁（図示せず）を有する培  
地供給口86が設けられている。この培地供給口86は、例  
えば第4図に示すように、内容器81の側壁から突出し、  
その入口90が内容器81の回転方向（矢印87で示す方向）  
の下流側に面する状態で設けられており、この入口90に  
は当該入口90を開閉する開閉弁が設けられている。この  
例においては、矢印87で示した回転方向に内容器81が回  
転されるとこれに伴って培地供給口86が回転移動され、  
この回転移動により入口90に設けた開閉弁が内容器81外  
の液体培地から押圧力を受けて開き、そしてこの開閉弁  
は内容器81が回転されている期間中は継続して開いた状  
態となり、この内容器81の回転移動期間中において内容  
器81外の液体培地が内容器81内に供給される。そして内  
容器81の回転が停止すると開閉弁はその復元力により閉  
じて培地供給口86の入口90を塞ぎ、これにより内容器81  
の回転が停止されている期間中は液体培地の内容器81内  
への供給が停止されると共に内容器81内の溶培対象細胞  
もしくは植物組織が内容器81外に流出することが防止さ  
れる。88は内容器81の側板89の一部に設けた細胞もしく  
は植物組織に対し不透透性で液体培地透過性の網または  
膜である。61、62、63、64、65、66は第1図に示したも  
のと同様のものを表す。なお回転駆動部は省略してあ  
る。

この例の培養装置においては、網または膜88において内  
容器81内部の液体培地が内容器81外に移動すると共に内  
容器81外の新しい液体培地が内容器81内に移動して液体  
培地の交換が適宜行われ、そして内容器81が回転される  
間、培地供給口86において内容器81外の新しい液体培地

が内容器81内に供給され、これにより内容器81内の培養  
対象細胞もしくは植物組織は常時新しい液体培地に接触  
するようになり、この結果高い効率で細胞もしくは植物  
組織の培養を達成することができる。

本発明の適用においては、培養されるべき細胞もしくは  
植物組織としては何ら制限されるものではなく、例えば  
リンパ球、リンパ芽球、パーキットクンパ腫、急性リン  
パ芽球性白血病細胞、骨髓腫などのミエローム細胞また  
はこれらによるハイブリドーマ細胞などの浮遊増殖性細  
胞、ヒト子宮ガン細胞HeLaチャイニーズ-ハムスター肺  
細胞V-79、ヒト胎児肺細胞MRC-5、チンパンジー  
肝繊維芽細胞、ヒト包皮細胞、ニワトリ胎児繊維芽細  
胞、初代サル腎細胞、マウス転移繊維芽細胞、脳下垂体  
腫瘍細胞、アフリカミドリザル腎細胞Vero、副腎腫瘍細  
胞などの接着依存性細胞、セリバオウレンプロトプラ  
スト、ハナキリンプロトプラスト、タバコ葉肉細胞プロ  
トプラスト、ニンジンプロトプラスト、ゼニゴケのカル  
ス、ダイズのカルス、ムラサキのカルス、イチゴ茎頂、  
トマト茎頂、パレイショの野生種(Solanum goniocalyx)  
の茎頂、エンドウの茎頂、カーネーションの茎頂、ア  
スパラガスの茎頂、クロレラなどの植物におけるプロ  
トプラスト、カルス、植物体の一部をなす組織などの植物  
組織が挙げられる。

本発明の適用における細胞培養用の液体培地は特に限定  
されるものではなく、公知の培地をそのまま使用するこ  
とができ、例えばRPMI 1640培地、イーグルMEM  
培地、ダルベツコ変法イーグル培地、Earle 培地 199、  
ハムF12培地などを挙げることができ、これらの培地に  
は、5~10容量%の割合で、例えば胎児ウシ血清、新生  
児ウシ血清、ウマ血清、ヒト血清を添加して用いること  
が好ましい。血清を用いない無血清培地、例えばHB 1  
02（ハナバイオロジクス社）、RITC 55-9培地など  
を用いることができる。これらの液体培地の比重は1.00  
~1.05のものが一般的である。なおこれらの液体培地  
には通常酸素および炭酸ガスを溶存させることが必要で  
あり、産生細胞の生存維持は、通常、30~40℃、好まし  
くは36~37℃で行う。

また本発明の適用における植物組織の培養用液体培地  
は、特に限定されるものではないが、例えばリンスマイ  
ヤースクーグ(Linsmaier-Skoog)の液体培地、ムラシゲ  
ースクーグ(Murashige-Skoog)の液体培地、MG-5  
（商品名）培地などが挙げられる。

液体培地の比重としては1.00~1.05のものが一般的であ  
る。なお液体培地には、酸素を溶存させることが必要で  
ある。なお培養時の液体培地の温度は通常10~40℃であ  
り、好ましくは20~30℃である。

さらに接着依存性細胞を培養する場合に用いる担体粒子  
も特に制限があるものではなく、接着依存性細胞の接着  
性および増殖性に適したものであればよく、例えばポリ  
スチレンなどの合成高分子、タン白質や多糖類などの天

然高分子により表面が形成された粒子を挙げるができるが、担体粒子は磁性を有するものであることが便利であり、これによって磁石を用いて担体粒子の捕集、移動、処理、その他の取扱いを簡便に且つ迅速に行うことが可能となる。

磁性を有する担体粒子としては、磁性体粉を高分子材料により結着してなるもの、磁性を有するコアを高分子材料により被覆してなるものがあり、磁性体の具体例としては、鉄、コバルト、ニッケル、これらの合金、低炭素鋼、ケイ素鋼、γ-酸化鉄、フェライト、マグネタイト、その他を挙げるができる。担体粒子の比重は、液体培地の粘性および比重などによっても異なるが、一般的に1.0~1.5の範囲内のものとされる。また担体粒子の粒径は40~500μm程度が好ましく、形状は球形が望ましいが、顆粒状、円筒状などであってもよく、不定形のものであっても差支えない。

液体培地1ml当りの浮遊増殖性細胞もしくは植物組織または接着依存性細胞の播種量は、一般的には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個であり、接着依存性細胞を培養するために使用する担体粒子の数は、通常液体培地1ml当り $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個である。

なお上記条件などにおいて、細胞もしくは植物組織は液体培地よりも比重が小さくてもよく、液体培地より比重が小さい細胞もしくは植物組織は、重力によらずに浮力によって、比重が大きい細胞もしくは植物組織の場合と同様に液体培地中において運動し均一に分散するようになる。

#### 〔実施例〕

以下本発明の培養装置を用いて実際に行った培養実施例について説明する。

#### 実施例1

培養細胞：チャイニーズハムスター肺繊維芽細胞由来の「V-79」

液体培地：10体積%牛胎児血清を含む「Eagle-MEM」

粘度：0.01poise、比重：1.01

担体粒子：「Cytodex III」(Pharmacia社製)

粒径：180μm、比重：1.03

第1図に示した構成の容積1.5ℓの培養容器と容積800mlの内容容器とを有する培養装置を用い、培養容器に1ℓの上記液体培地を入れて内容容の全体が液体培地中に完全に浸漬された状態とし、下記の条件下で上記細胞の培養を行った。すなわち、内容容内液体培地800mlに対して、乾燥重量で2.4g(約 $9.6 \times 10^6$ 個)の上記担体粒子を用い、液体培地1ml当り $1 \times 10^4$ 個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において144時間に亘り、内容容を回転数15 r.p.m.で回転せしめながら、培養容器に液体培地を35ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気を培養容の上部空間に供給し続け、液体培地内の溶存酸素が2 ppm以下に低下したときには供給空気内の

酸素分圧を酸素ガスを供給することにより高め、溶存酸素量をコントロールした。

その結果、担体粒子上の細胞数は、液体培地1ml当り平均 $4.5 \times 10^6$ 個であった。

#### 比較例1

内容容1.5ℓのスピンナービンを用い、実施例1における同様の培養細胞、液体培地および担体粒子を用いて細胞の培養を行った。すなわち、スピンナービンに液体培地800mlに対して乾燥重量で2.4gの担体粒子を加え、ついで液体培地1ml当り $1 \times 10^4$ 個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において回転子の回転数を30 r.p.m.で回転せしめながら、液体培地を35ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気をスピンナービンの上部に供給し続けた。

その結果、担体粒子上の細胞数は液体培地1ml当り平均 $5.2 \times 10^5$ 個であった。

#### 比較例2

第1図に示した構成の容積1.5ℓの培養容器と容積800mlの内容容器とを有する培養装置を用い、培養容器に実施例1における同じ液体培地を約0.6ℓ入れて内容容の下部における直径の2/3の部分のみが液体培地中に浸漬された状態とし、下記の条件下で培養を行った。すなわち、内容容内の液体培地に、乾燥重量で2.4g(約 $9.6 \times 10^6$ 個)の担体粒子を用い、液体培地1ml当り $1 \times 10^4$ 個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において144時間に亘り、内容容を回転数15 r.p.m.で回転せしめながら、培養容器に液体培地を35ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気を培養容の上部空間に供給し続け、液体培地内の溶存酸素が2 ppm以下に低下したときには供給空気内の酸素分圧を酸素ガスを供給することにより高め、溶存酸素量をコントロールした。

その結果、担体粒子上の細胞数は、液体培地1ml当り平均 $5.5 \times 10^5$ 個であった。

#### 実施例2

培養細胞：ヒト胎児肺由来細胞 Flow-2000

液体培地：10V/V%牛胎児血清を含む「Eagle-MEM」

粘度：0.01poise、比重：1.01

担体粒子：「Cytodex III」(Pharmacia社製)

粒径：180μm、比重：1.03

第1図に示した構成の容積1.5ℓの培養容器と容積800mlの内容容器とを有する培養装置を用い、培養容器に1ℓの上記液体培地を入れて内容容の全体が液体培地中に完全に浸漬された状態とし、下記の条件下で上記細胞の培養を行った。すなわち、内容容内液体培地800mlに対して、乾燥重量で4.8g(約 $1.9 \times 10^7$ 個)の担体粒子を用い、液体培地1ml当り $4 \times 10^4$ 個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において144時間に亘り、内容容を回転数15 r.p.m.で回転せしめながら、培養容

に液体培地を40ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気を培養容器上部に供給し続け、液体培地内の溶存酸素が2 ppm 以下に低下したときには供給空気内の酸素分圧を酸素ガスを供給することにより高め、溶存酸素量をコントロールした。

その結果、担体粒子上の細胞数は、液体培地1ml当り平均  $8.3 \times 10^5$  個であった。

#### 比較例3

内容器1.5ℓのスピンナービンを用い、実施例2における同様の培養細胞、液体培地および担体粒子を用いて細胞の培養を行った。すなわち、スピンナービンに液体培地800mlに対して乾燥重量で4.8gの担体粒子を加え、ついで液体培地1ml当り  $4 \times 10^4$  個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において回転子の回転数を30 r.p.m. で回転せしめながら、液体培地を40ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気をスピンナービンの上部に供給し続けた。

その結果、担体粒子上の細胞数は液体培地1ml当り平均  $3.8 \times 10^5$  個であった。

#### 比較例4

第1図に示した構成の容積1.5ℓの培養容器と容積800mlの内容器とを有する培養装置を用い、培養容器に実施例1における同じ液体培地を約0.6ℓ入れて内容器の下部における直径の2/3の部分のみが液体培地中に浸漬された状態とし、下記の条件下で培養を行った。すなわち、内容器内の液体培地に、乾燥重量で4.8g (約  $1.9 \times 10^7$  個)の担体粒子を用い、液体培地1ml当り  $4 \times 10^4$  個の培養細胞を播種し、温度37℃の環境下において144時間に亘り、内容器を回転数15 r.p.m. で回転せしめながら、培養容器に液体培地を40ml/hrの割合で供給し、また同量の液体培地を排出させた。このとき5%炭酸ガスを含む空気を培養容器の上部空間に供給し続け、液体培地内の溶存酸素が2 ppm 以下に低下したときには供給空気内の酸素分圧を酸素ガスを供給することにより高め、溶存酸素量をコントロールした。

その結果、担体粒子上の細胞数は、液体培地1ml当り平均  $4.0 \times 10^5$  個であった。

〔発明の効果〕

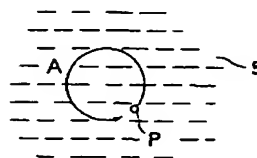
\* 以上のように、本発明の培養装置においては、培養される細胞もしくは植物組織に対し不透透性で液体培地透過性の網または膜により壁の少なくとも一部が構成された内容器が、培養容器に入れた液体培地内にその全体が完全に浸漬された状態とされ、この内容器が実質上水平な軸の周りに自転するよう回転されることにより、当該内容器内の液体培地と、細胞もしくは植物組織との混合系が当該内容器と共に回転され、これにより、当該内容器内において細胞もしくは植物組織が培養されるので、かかる培養対象細胞もしくは植物組織を常時新しい液体培地と接触させた状態とすることができうるうえ培養対象細胞もしくは植物組織を内容器内の液体培地中に実質上剪断力を与えずに均一に分散させた状態で培養を行うことができ、この結果高い効率で培養対象細胞もしくは植物組織の培養を達成することができる。

〔図面の簡単な説明〕

第1図は本発明培養装置の一例を示す説明図、第2図は本発明の培養装置を用いて培養を行う場合のシステムチャートの一例を示す説明図、第3図および第4図はそれぞれ本発明培養装置の他の例を示す説明用正面図および説明用側面図、第5図は、液体培地中における粒子の運動についての説明図である。

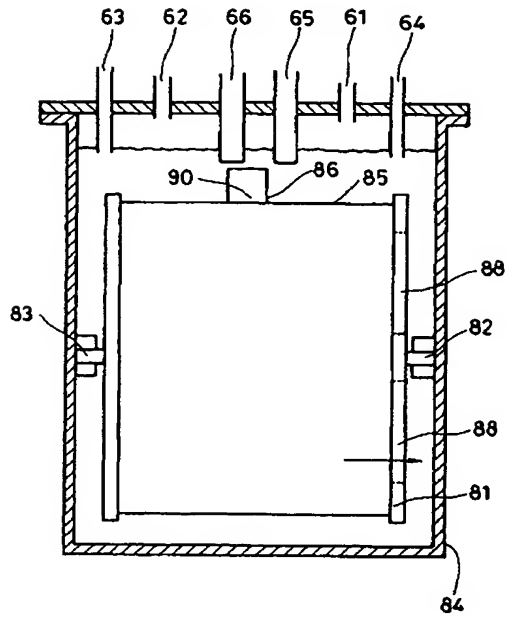
- 1……容器部、2……回転駆動部
- 3……容器、4……内容器
- 31,32……回転軸、35……培地循環管
- 36……ポンプ、41……網または膜
- 42……筒壁、43,44……側板
- 21……モーター、22……回転磁石体
- 23……保持板、24……磁石
- 45……磁石、5……液体培地
- 61……送気管、62……排気管
- 63……液体培地供給管、64……液体培地排出管
- 65……pHセンサー、66……DOセンサー
- 70……液体培地タンク、71……培養容器
- 72……液体培地排出タンク
- 73……モニター機構、74……pHセンサー
- 75……DOセンサー、81……内容器
- 82,83……回転軸、84……容器
- 86……培地供給口、88……網または膜
- 90……培地入口

〔第5図〕

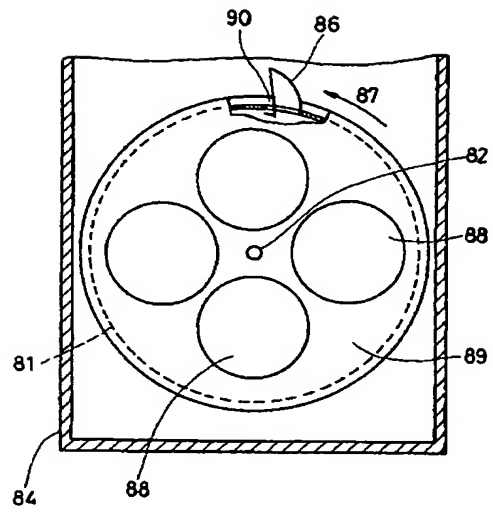


The schematic diagram illustrates a gas supply system. At the top, three vertical lines represent gas inlets labeled 'I F-' (likely ICF), 'CO<sub>2</sub>', and 'O<sub>2</sub>'. Each inlet is equipped with a valve symbol (two triangles meeting at a point). These three lines converge into a single horizontal line that leads to a rectangular component labeled '73'. Below component '73' is a vertical tube labeled '74'. This tube connects to a larger rectangular component labeled '71'. Component '71' has an arrow pointing into its top surface, indicating gas flow. To the left of component '71' is another rectangular component labeled '70', connected to '71' by a horizontal line. To the right of component '71' is a third rectangular component labeled '72', also connected to '71' by a horizontal line. A label '75' points to the vertical tube '74'.

【第3図】



【第4図】





[JP,06-044860,B]

---

CLAIMS DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE  
INVENTION TECHNICAL PROBLEM MEANS EXAMPLE DESCRIPTION OF DRAWINGS  
DRAWINGS

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] A part of the vessel wall [ at least ] prepared in the container into which a liquid medium is put, and this container The content machine made into the state where it was constituted by the network or film of the liquid-medium permeability in impermeability to the cell or plant tissue cultivated, and the whole was completely immersed in the aforementioned liquid medium, When it comes to have the rotation mechanical component which rotates this content machine so that it may rotate around a level shaft on parenchyma and the aforementioned content machine rotates When a mixed stock with the anchorage dependent cell, suspension proliferation sexual cell, or plant tissue pasted up on the liquid medium and support particle in the content machine concerned rotates with the content machine concerned The culture apparatus characterized by cultivating the anchorage dependent cell, suspension proliferation sexual cell, or plant tissue pasted up on the support particle in the aforementioned content machine.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[Industrial Application]

this invention relates to the culture apparatus of a cell or a plant tissue.

[Description of the Prior Art]

Generally it sets to cultivation of a cell or a plant tissue. When the candidate for cultivation is able to increase after the cell or the plant tissue itself has floated in a suspension proliferation sexual cell or a plant tissue, i.e., a liquid medium It is required to make a culture medium contact by making it float in the liquid medium which is the nutrient. Moreover, it is required to make a liquid medium contact, after pasting up the cell concerned on the front face of a suitable base, when the adhesion to a base is an indispensable cell, in order that the candidate for cultivation may grow and increase in an anchorage dependent cell, i.e., a liquid medium. And since a big adhesion area can be easily obtained as a base on which an anchorage dependent cell is pasted up, in recently, the support particle of a minor diameter is used increasingly.

As a method for performing cultivation of such an anchorage dependent cell, a suspension proliferation sexual cell, or a plant tissue, the method (refer to JP,50-100223,A \*\*\*\*\* and JP,59-146598,A \*\*\*\*\*) of cultivating a cell in it, and the other methods are learned, agitating a liquid medium according to mechanical agitation mechanisms, such as a rotary wing, conventionally.

It is \*\*\*\* trouble] in order that [invention may be solved.

In order to carry out a deer and to cultivate the target cell at high efficiency, it is important to contact the cell for cultivation to an always new culture medium, and it is required to make the support particle (for these to be doubled below and for it to only be called a "cell".) which for that the suspension proliferation sexual cell or the anchorage dependent cell pasted up distribute uniformly in a liquid medium.

Moreover, it is very advantageous, when becoming possible for the deployment area of the front face of the support particle which can be used for adhesion of the cell concerned to become large, therefore to paste up a cell on a support particle at the high rate of adhesion and raising cultivation efficiency, if a support particle can be made to distribute uniformly in the liquid medium with which the cell concerned was mixed in case an anchorage dependent cell is pasted up on the support particle which is a base.

Although the method of agitating the system which mixed the cell for cultivation by the rotary wing is common in a liquid medium in the former as a method for contacting the cell for cultivation to an always new liquid medium However, since this method is the method of applying shearing force to the mixed stock of a liquid medium and a cell, and distributing the cell concerned, the collision with a rotary wing — or it cannot avoid that the cell under cultivation is damaged by operation of big shearing force, but has the trouble that cultivation efficiency is low and this method may be unable to be used after all, depending on the kind of cell

Moreover, in order to enforce the method like the above, in constituting mass cell culture equipment for the purpose of a mass culture, an agitator large-sized for churning is needed, shearing force also becomes large inevitably, therefore it also has the trouble that cultivation efficiency comes to fall further. Although various policies are studied in order to cancel such a

trouble, the present condition is that the cell culture equipment which essentially solves this trouble is not yet developed.

The above-mentioned situation is the same also in cultivation of a plant tissue.

#### [Objects of the Invention]

without the place which this invention is completed as a result of repeating research wholeheartedly based on the situation like a not less, and is made into the purpose essentially gives shearing force to a mixed stock with a liquid medium, the cell for cultivation, or a plant tissue -- the inside of a liquid medium -- a cell -- carrying out -- a plant tissue can be distributed uniformly and it is in offering the equipment which can perform cultivation of a cell or a plant tissue at high efficiency

#### [Means for Solving the Problem]

Formed the culture apparatus of this invention in the container into which a liquid medium is put, and this container. The content machine with which a part of the vessel wall [ at least ] is constituted the network or film of the liquid-medium permeability in impermeability to the cell or plant tissue cultivated, and the whole is made into the state where it was completely immersed in the aforementioned liquid medium, When it comes to have the rotation mechanical component which rotates this content machine so that it may rotate around a level shaft on parenchyma and the aforementioned content machine rotates When the mixed stock of the liquid medium in the content machine concerned, and a cell or a plant tissue rotates with the content machine concerned It is what is characterized by cultivating a cell or a plant tissue in the aforementioned content machine. by this composition a cell or a plant tissue is uniformly distributed in a content machine, without giving parenchyma top shearing force -- it can make -- moreover -- a network or a film -- minding -- the high high rate which can exchange the liquid medium of content machine inside and outside therefore -- a cell -- carrying out -- a plant tissue can be cultivated

A drawing explains this invention concretely below.

A view 1 is a schematic diagram showing an example of this invention culture apparatus, and equipment is constituted by the container section 1 and the rotation mechanical component 2 in this example of a view 1.

The container section 1 is constituted by a container 3 and the tubed content machine 4, and it is substantially extended in the level direction in a container 3, and in order to support the content machine 4 to revolve possible [ rotation ] on the side attachment wall of a container 3, one axis of rotation 31 and the axis of rotation 32 of another side are formed. In this example, the path for the interior of a shaft being hollow and the axis of rotation 32 of another side circulating a liquid medium in the content machine 4 (direction shown by the arrow) is formed, the axis of rotation 32 of this another side is arranged in the state where it was inserted in in the content machine 4 from the exterior of a container 3, and the edge opening 33 is opening it for free passage in the content machine 4. The pipe connected to the axis of rotation 32 of another side in the exterior of a container 3 is crooked, and it is extended up, and is arranged at the state where it was buried in the liquid medium 5 with which the edge opening 34 was filled up into the interior of the container 36 concerned from the upper part of a container 3, and the culture-medium circulation pipe 35 for this circulating through a liquid medium 5 is constituted. 36 is a pump and the liquid medium of the upper part of a container 3 circulates through it in the content machine 4 through the culture-medium circulation pipe 35 if needed with this pump 36. The content machine 4 is constituted by \*\*\*\* 42 which consisted of impermeability with the network or film 41 of liquid-medium permeability to the cell or the plant tissue, the side plates 43 and 44 prepared so that the both ends of this \*\*\*\* 42 might be taken up, and the connecting plate (not shown) which connects these side plates 43 and 44, and holds aforementioned \*\*\*\* 42. The aforementioned network or a film 41 is the thing of the liquid-medium permeability in impermeability to a cell or a plant tissue, as mentioned above. Or it can move to the interior from the exterior. \*\*\*\* 42 which consists of this -- minding -- a liquid medium -- the exterior from the interior of the content machine 4 -- And since the anchorage dependent cell, suspension proliferation sexual cell, or plant tissue pasted up on the support particle in the content machine 4 cannot pass \*\*\*\* 42 concerned, the cell or plant tissue which is a candidate for cultivation will

be in the state of certainly existing in the content machine 4. Therefore, distributing the cell for cultivation, or a plant tissue uniformly by rotating the content machine 4, where the cell for cultivation or a plant tissue concerned is contacted to an always new liquid medium, it can cultivate. Moreover, you may make it circulate the liquid medium of the upper part of a container 3 in the content machine 4 through the culture-medium circulation pipe 35 if needed with the aforementioned pump 36, and the liquid medium in the content machine 4 can be quickly exchanged in this case.

The size of the hole of the aforementioned network or a film 41 takes into consideration the size of the cell for cultivation, or a plant tissue etc., and is selected. Although it cannot generally specify, in cultivating by making the support particle which the anchorage dependent cell pasted up, for example exist in the content machine 4, the size of a hole In being 10–50 micrometers preferably and cultivating by making 5–200 micrometers of suspension proliferation sexual cells exist in the content machine 4, usually, the size of a hole Usually, when cultivating 0.1–10 micrometers by making a plant tissue exist in the content machine 4 moreover it is 3–5 micrometers preferably, 0.5–200 micrometers of sizes of a hole are usually 3–10 micrometers preferably. If trouble is not caused to cultivation of a cell or a plant tissue, although the quality of the material which constitutes the aforementioned network or a film 41 is not limited especially, nylon, Teflon (tradename), etc. can be used for it, for example.

The rotation mechanical component 2 is constituted in this example by a motor 21 and the rotation magnet object 22 which rotates by this motor 21, and the rotation magnet object 22 is constituted by the maintenance board 23 located so that it might be supported to revolve by the motor 21 and the axis of rotation might become level, and the magnet 24 fixed to this maintenance board 23. A magnet 45 fixes to one side plate 43 of the content machine 4, and it is prepared, the rotation magnet object 22 is arranged so that this magnet 45 may be countered, and it can be made to rotate by rotating the rotation magnet object 22 by the motor 21, so that the content machine 4 may be rotated around the axes of rotation 31 and 32 by the magnetism between a magnet 24 and a magnet 45. In this rotation mechanical component 2, especially the composition is not limited but the method of rotating the content machine 4 can be chosen freely.

The axes of rotation 31 and 32 of the content machine 4 can make homogeneity distribute further the cell or plant tissue in a liquid medium in the content machine 4 by being arranged a real waterworks common being desirable and making it such. Namely, it sets in the state where the content machine 4 rotates. A mixed stock with the liquid medium in the content machine 4, a cell, or a plant tissue comes to rotate regularly around the axis of rotation in the state where there is no flow mechanical in one so to speak as the content machine 4 by the viscosity of a liquid medium. Therefore, a cell or a cellular structure will change the existence position to the outside of the content machine 4, without changing most relative positions to the liquid medium in the content machine 4. For this reason, to the cell or plant tissue in the content machine 4, from a different direction one by one, it will be in the state where gravity acts and, thereby, a cell or a plant tissue will come to distribute uniformly in a liquid medium. If this sees about one cell or a plant tissue, as typically shown in a view 5, it will carry out the circular motion as a cell or a plant tissue P concerned shows by Arrow A relatively in a liquid medium 5, and will be considered that a cell or a plant tissue P distributes uniformly in a liquid medium 5 according to this movement force. in here, the axes of rotation 31 and 32 are real waterworks common — the inclination of the axes of rotation 31 and 32 — for example, — level — receiving — a maximum of — by saying the case where it is within the limits to about about 15 degrees, and receiving horizontally preferably, less than 5 times, although it is the inclination of less than 3 times more preferably, in the case of which, the content machine 4 shall be completely immersed in a liquid medium

although the rotational speed of the content machine 4 is taken into consideration and selected and cannot generally specify a configuration, a size, etc. of the size of the cell for cultivation, or a plant tissue and specific gravity, the viscosity of a liquid medium, and the content machine 4 — usually — 3 – 60 r.p.m. — desirable — 10 – 30 r.p.m. The content machine 4 is rotated so that it may become the rotational speed of a grade.

61 is the airpipe prepared in the upper part of a container 3, in the case of a plant tissue, air can be supplied for the air which contains the carbon dioxide gas it is 5% in the case of [ whose ] a cell (for example, concentration) with this airpipe 61 in the up space of a container 3, and, thereby, the dissolved acid quantum of a liquid medium 5 can be maintained at the fixed state of having been suitable for each of a cell and a plant tissue. Moreover, it may supply carrying out bubbling of the direct above-mentioned air into a liquid medium 5 if needed, and the dissolved acid quantum of a liquid medium can be adjusted, without doing an injury to a cell or a plant tissue with a foam, since a foam does not go into the interior of the content machine 4 in this case. Furthermore, while supplying a liquid medium at a rate more fixed than the liquid-medium supply pipe 63, a liquid medium can also be eliminated at same rate from the liquid-medium exhaust pipe 64. As for an exhaust pipe and 65, 62 is [ pH sensor and 66 ] DO sensors. A view 2 is an example of the system chart in the case of performing cultivation of a cell or a plant tissue using this invention culture apparatus. In 70, a liquid-medium tank and 71 show a cultivation container, and 72 shows a liquid-medium eccrisis tank. About the liquid medium of the cultivation container 71, the pH sensor 74 is detected pH, a dissolved acid quantum is detected by the DO sensor 75 in a row, and the carbon dioxide gas supplied to the cultivation container 71 according to the result and oxygen, and the amount of air supply are controlled by the monitor mechanism 73.

Since \*\*\*\* 42 of the content machine 4 is constituted from impermeability by the network or film 41 of liquid-medium permeability to the cell or the plant tissue according to the culture apparatus of composition of having been shown in the view 1 Or it can move to the interior from the exterior. \*\*\*\* 42 concerned -- minding -- a liquid medium -- the exterior from the interior of the content machine 4 -- Therefore, since it can consider as the state where the cell for cultivation or the plant tissue was contacted to the always new liquid medium and the cell for cultivation or plant tissue in the content machine 4 moreover cannot pass \*\*\*\* 42 concerned The cell for cultivation or a plant tissue will be in the state of certainly existing in the content machine 4. And where the cell or plant tissue which is a candidate for cultivation since it cultivates rotating the content machine 4 concerned in the state where the cell for cultivation or the plant tissue was made to exist in the content machine 4 in this way is uniformly distributed in the liquid medium in the content machine 4, it can cultivate. Cultivation of the cell for cultivation or a plant tissue can be attained at high efficiency so that I may be understood also from explanation of the cultivation example mentioned later as a result.

And since the axis of rotation 32 of another side of the content machine 4 forms in this example, the path 35, i.e., the culture-medium circulation pipe, for the interior being hollow and circulating through a liquid medium The new liquid medium of the upper part of a container 3 can be circulated in the content machine 4 with this culture-medium circulation pipe 35 if needed, therefore the liquid medium in the content machine 4 can be quickly exchanged with easy composition. And the edge opening 33 of the axis of rotation 32 of another side which is the culture-medium outlet of the culture-medium circulation pipe 35 can be circulated in [ whole ] the content machine 4, without inclining a new liquid medium in the state where the content machine 4 was rotated, since it will be located on the center in the content machine 4, i.e., the medial axis of rotation of the content machine 4.

A view 3 and the 4th view are the front view for explanation and the side elevations for explanation showing other examples of this invention culture apparatus, respectively. In this example, it is supported to revolve by the axes of rotation 82 and 83 of the couple to which the content machine 81 is extended to a real waterworks common possible [ rotation in a container 84 ], and the culture-medium feed hopper 86 which has an opening-and-closing valve (not shown) for supplying the liquid medium besides the content machine 81 in the content machine 81 is formed in the side-attachment-wall section 85 of the content machine 81. As this culture-medium feed hopper 86 is shown for example, in the 4th view, it projects from the side attachment wall of the content machine 81, and is prepared in the state where the entrance 90 faces the downstream of the hand of cut (direction shown by the arrow 87) of the content machine 81, and the opening-and-closing valve which opens and closes the entrance 90 concerned is prepared in this entrance 90. If the content machine 81 rotates to the hand of cut

shown by the arrow 87 in this example, the culture-medium feed hopper 86 will be rotated in connection with this. The opening-and-closing valve prepared in the entrance 90 by this rotation opens in response to the press force from the liquid medium besides the content machine 81. And it will be in the state where it opened continuously, during the period when the content machine 81 is rotating this opening-and-closing valve, among these the liquid medium besides the content machine 81 will be supplied in the content machine 81 during the rotation of a container 81. And if rotation of the content machine 81 stops, an opening-and-closing valve will be closed according to the stability, and will plug up the entrance 90 of the culture-medium feed hopper 86, and during the period when rotation of the content machine 81 is stopped by this, while supply into the content machine 81 of a liquid medium is stopped, it is prevented that the cell for \*\*\*\* or plant tissue in the content machine 81 flows out out of the content machine 81. 88 is the network or film of the liquid-medium permeability in impermeability to the cell or plant tissue prepared in a part of side plate 89 of the content machine 81. 61, 62, 63, 64, 65, and 66 express what was shown in the view 1, and the same thing. In addition, the rotation mechanical component is omitted.

In the culture apparatus of this example, while the liquid medium of the content machine 81 interior moves out of the content machine 81 in a network or a film 88, the new liquid medium besides the content machine 81 moves into the content machine 81, and exchange of a liquid medium is performed suitably. And while the content machine 81 rotates, in the culture-medium feed hopper 86, the new liquid medium besides the content machine 81 is supplied in the content machine 81. Thereby, the cell for cultivation or plant tissue in the content machine 81 comes to contact an always new liquid medium, and, as a result, can attain cultivation of a cell or a plant tissue at high efficiency.

As the cell which should be cultivated in application of this invention, or a plant tissue, it is not what is restricted at all. For example, a lymphocyte, a lymphoblast, bar kit KUMPA \*\*, an acute-lymphoblastic-leukemia cell, Suspension proliferation sexual cells, such as myeloma cells, such as myeloma, or a hybridoma cell by these, The Homo sapiens uterus gun cell HeLa Chinese hamster pneumocyte V-79, Homo sapiens embryo pneumocyte MRC-5, a chimpanzee liver fibrocyte, A Homo sapiens prepuce cell, a fowl embryo fibrocyte, the first ape nephrocyte, a mouse transition fibrocyte, Anchorage dependent cells, such as a hypophysis tumor cell, the African green monkey nephrocyte Vero, and an adrenal-tumor cell, A SERIBA coptis root protoplast, the Hana KIRIN BREWERY protoplast, a tobacco mesophyll-cell protoplast, A ginseng protoplast, the callus of a liverwort, the callus of soybeans, the callus of MURASAKI, A strawberry apex, a tomato apex, the apex of the wild species (*Solanumgoniocalyx*) of a potato, Plant tissues, such as an organization which makes a part of protoplast in vegetation, such as an apex of a pea, an apex of a carnation, an apex of asparagus, and chlorella, callus, and plant body, are mentioned.

It is not limited, and a well-known culture medium can be used as it is, for example, especially the liquid medium for cell cultures in application of this invention is RPMI. 1640 culture media, an eagle MEM culture medium, an Dulbecco's modified Eagle's medium, and Earle Culture medium It is desirable to be able to mention 199, hum F12 culture medium, etc., to be the rate of 5 - 10 capacity %, for example, to add and use embryo bovine serum, newborn infant bovine serum, horse serum, and a man blood serum for these culture media. The serum free medium 102 (HANABAIOROJIKUSU) which does not use a blood serum, for example, HB, 55 to RITC9 culture medium, etc. can be used. The specific gravity of these liquid media has the common thing of 1.00-1.05. In addition, it is required for these liquid media to make oxygen and carbon dioxide gas usually dissolved, and 30-40 degrees C of survival maintenance of a production cell are usually preferably performed at 36-37 degrees C.

Moreover, although especially the liquid medium for cultivation of the plant tissue in application of this invention is not limited, the liquid medium of rinse MAIYA-SUKUGU (Linsmaier-Skoog), the liquid medium of Murashige-SUKUGU (Murashige-Skoog), MG-5 (tradename) culture medium, etc. are mentioned, for example.

As specific gravity of a liquid medium, the thing of 1.00-1.05 is common. In addition, it is required for a liquid medium to make oxygen dissolved. In addition, the temperature of the liquid medium

at the time of cultivation is usually 10–40 degrees C, and is 20–30 degrees C preferably. It is not that in which especially the support particle used when cultivating an anchorage dependent cell furthermore also has a limit. Although the particle in which the front face was formed of naturally-occurring polymers, such as synthetic macromolecules, such as polystyrene, tongue white matter, and polysaccharide, can be mentioned that what is necessary is just suitable for the adhesive property of an anchorage dependent cell, and proliferation nature. It becomes as for a support particle, it is convenient that it is what has magnetism, and possible to perform that it is simple and quickly the uptake of a support particle, movement, processing, and the handling of others using a magnet by this.

As a support particle which has magnetism, there are a thing which comes to bind magnetic-substance powder by polymeric materials, and a thing which comes to cover with polymeric materials the core which has magnetism, and iron, cobalt, nickel, these alloys, low-carbon steel, silicon steel, a gamma ferric oxide, a ferrite, a magnetite, and others can be mentioned as an example of the magnetic substance. Although the specific gravity of a support particle changes with the viscosity of a liquid medium, specific gravity, etc., generally let it be the thing of 1.0–1.5 within the limits. Moreover, although the particle size of a support particle has desirable about 40–500 micrometers and the globular form of a configuration is desirable, it may have the shape of the shape of granulation, and a cylinder etc., and even if it is the thing of an indeterminate form, it does not interfere.

Generally the suspension multiplication sexual cell per 1ml of liquid media, a plant tissue, or the amount of seeding of an anchorage dependent cell is  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^6$ . The number of the support particles which are individuals, and are used in order to cultivate an anchorage dependent cell is usually per [  $1 \times 10^4$  to  $1 \times 10^7$  ] 1ml of liquid media. It is an individual.

In addition, in the above-mentioned conditions etc., the cell or the plant tissue with specific gravity smaller [ a cell or a plant tissue ] than a liquid medium and specific gravity smaller than a liquid medium exercises into a liquid medium like the case where specific gravity is a large cell or a plant tissue, by buoyancy, without being based on gravity, and it comes to distribute it uniformly.

[Example]

The cultivation example actually performed using the culture apparatus of this invention below is explained.

Example 1 cultured cell: "V-79" of the Chinese hamster lung fibrocyte origin

Liquid medium: "Eagle-MEM" containing 10 volume % fetal calf serum

Viscosity : 0.01poise, specific gravity:1.01 support particle : "Cytodex III" (product made from Pharmacia) Particle size: Cultivation \*\*\*\* and capacity of capacity 1.5\*\* of composition of

having been shown in 180 micrometers, and the specific gravity:1.03 view 1 The culture apparatus which has a 800ml contents machine is used. It considered as the state where put the above-mentioned liquid medium of 1\*\* into the cultivation container, and the whole contents machine was completely immersed into the liquid medium, and the above-mentioned cell was cultivated under the following conditions. Namely, liquid medium in a contents machine The 2.4g (about  $9.6 \times 10^6$  individual) above-mentioned support particle is used with dry weight to 800ml.

Per [  $1 \times 10^4$  ] 1ml of liquid media Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C. It continues in 144 hours and is a contents machine Rotational frequency 15 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied to the cultivation container at a rate of 35 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made to discharge. Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the up space of a cultivation container is continued, and the dissolved oxygen in a liquid medium is 2 ppm. When it fell to below, the oxygen tension in a supply air was raised by supplying oxygen gas, and the dissolved acid quantum was controlled.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $4.5 \times 10^6$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

Also in the example 1, the cell was cultivated using the same cultured cell, the liquid medium, and the support particle using the spinner bottle of contents machine of example of comparison 1 1.5\*\*. That is, it is a liquid medium to a spinner bottle. A 2.4g support particle is added with dry



weight to 800ml, and, subsequently it is per [  $1 \times 10^4$  ] 1ml of fluid culture media. Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C, and is the rotational frequency of a rotator 30 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied at a rate of 35 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made. Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the upper part of a spinner bottle was continued.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $5.2 \times 10^5$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

The cultivation container and capacity of capacity 1.5\*\* of composition of having been shown in the example of comparison 2 view 1 It considered as the state where abbreviation 0.6\*\* Put the same liquid medium into the cultivation container also in the example 1, and only two thirds of the portions of the diameter in the lower part of a contents machine were immersed into the liquid medium using the culture apparatus which has a 800ml contents machine, and cultivated under the following conditions. Namely, a 2.4g (about  $9.6 \times 10^6$  individual) support particle is used for the liquid medium in a contents machine with dry weight. Per [  $1 \times 10^4$  ] 1ml of liquid media Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C. It continues in 144 hours and is a contents machine Rotational frequency 15 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied to the cultivation container at a rate of 35 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made to discharge. Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the up space of a cultivation container is continued, and the dissolved oxygen in a liquid medium is 2 ppm. When it fell to below, the oxygen tension in a supply air was raised from supplying oxygen gas, and the dissolved acid quantum was controlled.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $5.5 \times 10^5$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

Example 2 cultured cell: Man embryo lung origin cell Flow-2000 liquid medium: "Eagle-MEM" containing 10 V/V% fetal calf serum

Viscosity : 0.01poise, specific gravity:1.01 support particle : "Cytodex III" (product made from Pharmacia) Particle size: The cultivation container and capacity of capacity 1.5\*\* of composition of having been shown in 180 micrometers, and the specific gravity:1.03 view 1 The culture apparatus which has a 800ml contents machine is used. It considered as the state where put the above-mentioned liquid medium of 1\*\* into the cultivation container, and the whole contents machine was completely immersed into the liquid medium, and the above-mentioned cell was cultivated under the following conditions. Namely, liquid medium in a contents machine A 4.8g (about  $1.9 \times 10^7$  individual) support particle is used with dry weight to 800ml. Per [  $4 \times 10^4$  ] 1ml of liquid media Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C. It continues in 144 hours and is a contents machine Rotational frequency 15 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied to the cultivation container at a rate of 40 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made to discharge. Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the cultivation container upper part is continued, and the dissolved oxygen in a liquid medium is 2 ppm. When it fell to below, the oxygen tension in a supply air was raised from supplying oxygen gas, and the dissolved acid quantum was controlled.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $8.3 \times 10^5$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

Also in the example 2, the cell was cultivated using the same cultured cell, the liquid medium, and the support particle using the spinner bottle of content machine of example of comparison 3 1.5\*\*. That is, it is a liquid medium to a spinner bottle. A 4.8g support particle is added with dry weight to 800ml, and, subsequently it is per [  $4 \times 10^4$  ] 1ml of liquid media. Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C, and is the rotational frequency of a rotator 30 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied at a rate of 40 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made to Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the upper part of a spinner bottle was continued.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $3.8 \times 10^5$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

The cultivation container and capacity of capacity 1.5\*\* of composition of having been shown in the example of comparison 4 view 1 It considered as the state where abbreviation 0.6\*\* Put the same liquid medium into the cultivation container also in the example 1, and only two thirds of the portions of the diameter in the lower part of a content machine were immersed into the liquid medium using the culture apparatus which has a 800ml content machine, and cultivated under the following conditions. Namely, a 4.8g (about  $1.9 \times 10^7$  individual) support particle is used for the liquid medium in a content machine with dry weight. Per [  $4 \times 10^4$  ] 1ml of liquid media Seeding of the cultured cell of an individual is carried out, and it sets under environment with a temperature of 37 degrees C. It continues in 144 hours and is a content machine Rotational frequency 15 r.p.m. Making it rotate, the liquid medium was supplied to the cultivation container at a rate of 40 ml/hr, and the liquid medium of the amount of said was made to discharge. Supplying the air which contains carbon dioxide gas 5% at this time to the up space of a cultivation container is continued, and the dissolved oxygen in a liquid medium is 2 ppm. When it fell to below, the oxygen tension in a supply air was raised from supplying oxygen gas, and the dissolved acid quantum was controlled.

Consequently, the number of cells on a support particle is per [ an average of  $4.0 \times 10^5$  ] 1ml of liquid media. It was an individual.

#### [Effect of the Invention]

As mentioned above, it sets to the culture apparatus of this invention. The content machine by which some walls [ at least ] were constituted from impermeability with the network or film of liquid-medium permeability to the cell or plant tissue cultivated By rotating so that it may consider as the state where the whole was completely immersed in the liquid medium put into the cultivation container, among these a container may rotate around a level shaft on parenchyma Since the mixed stock of the liquid medium in the content machine concerned, and a cell or a plant tissue rotates with the content machine concerned and a cell or a plant tissue is cultivated in the content machine concerned by this It can cultivate, where the cell for cultivation or a plant tissue is uniformly distributed, without giving parenchyma top shearing force into the liquid medium in a content machine in being able to consider as the state where this cell for cultivation or plant tissue was contacted to the always new liquid medium. As a result, cultivation of the cell for cultivation or a plant tissue can be attained at high efficiency.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

## [Brief Description of the Drawings]

Explanatory drawing, the view 3, and the 4th view showing an example of a system chart in case explanatory drawing showing [ 1 ] an example of this invention culture apparatus and a view 2 cultivate using the culture apparatus of this invention are explanatory drawing about movement of the particle [ view / 5 / the front view for explanation showing other examples of this invention culture apparatus, respectively and the side elevation for explanation, and ] in a liquid medium.

1 .... The container section, 2 .. Rotation mechanical component  
 3 .... A container, 4 .. Content machine  
 31 32 .... The axis of rotation, 35 .. Culture-medium circulation pipe  
 36 .... A pump, 41 .. A network or film  
 42 .... 43 \*\*\*\*, 44 .. Side plate  
 21 .... A motor, 22 .. Rotation magnet object  
 23 .... A maintenance board, 24 .. Magnet  
 45 .... A magnet, 5 .. Liquid medium  
 61 .... An airpipe, 62 .. Exhaust pipe  
 63 .... A liquid-medium supply pipe, 64 .. Liquid-medium exhaust pipe  
 65 .... pH sensor, 66 .. DO sensor  
 70 .... A liquid-medium tank, 71 .. Cultivation container  
 72 .... Liquid-medium eccrisis tank  
 73 .... A monitor mechanism, 74 .. pH sensor  
 75 .... DO sensor, 81 .. Content machine  
 82 83 .... The axis of rotation, 84 .. Container  
 86 .... A culture-medium feed hopper, 88 .. A network or film  
 90 .... Culture-medium entrance

---

[Translation done.]